

#### I.4.4. Modelos animales.

En el año 1992, se desarrolló una cepa de ratones "knock-out" con ausencia de una o dos copias del gen p53 en su línea germinal (Donehower,1992). Estos ratones presentaban un desarrollo intrauterino normal pero, en la vida postnatal, presentaban tumores (linfomas T y sarcomas) de forma espontánea. La exposición de los ratones a radiaciones ionizantes aceleraba la aparición de aquel tipo de tumores (Kemp, 1994). Este primer modelo animal reforzaba el papel de gen supresor de tumores asignado a p53. Experimentos adicionales (Nicol,1995) utilizando ratones hembra p53+/- embarazadas demostraron que la exposición a productos químicos con actividad mutágena multiplicaba por 2-4 la toxicidad embrionaria. Por lo tanto, la deficiencia de p53 predispone a los efectos teratogénicos de fármacos y productos químicos (xenobióticos).

Posteriormente, se desarrolló un modelo animal para demostrar la hipótesis de Vogelstein y Kinzler (Vogelstein,1992) referente a la reducción de tetrámeros de p53 debida a un mecanismo viral. Para estudiar el compromiso de la infección de virus de la hepatitis B (HBV) en el desarrollo de tumores hepáticos, se introdujo un vector de expresión forzada de Hbx, un factor de transcripción del virus HBV en una cepa de ratones. La proteína Hbx bloquea el acceso de p53 al núcleo celular con la consecuente disminución de p53 funcional y los ratones transgénicos desarrollan tumores sin que existan mutaciones en el gen p53. Se demostró también que los dobles transgénicos Hbx+/ p53- presentaban tumores con una latencia mucho más corta (Ueda,1995).

Hirao y cols (Hirao,2000) obtuvieron una cepa de ratones Chk2-/Chk2-. La proteína Chk2 estabiliza la molécula de p53 mediante su unión con el residuo de serina en posición 20 y, con ello se inhibe la unión de p53 a Mdm2. Los ratones Chk2-/Chk2- eran incapaces de generar aumentos de p21 en respuesta a la radiación gamma. La reintroducción de Chk2 corregía estos defectos. De esta forma p14<sup>ARF</sup> y Chk2 constituyen las dos proteínas que rescatan a p53 de la degradación por la vía de ubiquitinación promovida por MDM.

Para demostrar que la proteína p53 es capaz de corregir alguno de los defectos asociados a la carencia de XRCC4 (XRCC4-/-) que se manifiesta con una elevada letalidad embrionaria, apoptosis neuronal y trastornos del crecimiento, se desarrolló un modelo animal de doble "knock-out" (XRCC4-/- y p53-/-) (Gao, 2000 ). Se observó que estos animales no presentaban el grave fenotipo asociado a XRCC4-/- sino que únicamente sufrían un defecto en la recombinasa inmune (V(D)J) y los ratones morían con linfomas que presentaban amplificaciones de c-myc y de los genes de inmunoglobulinas. Los fibroblastos de estos ratones presentaban una marcada inestabilidad cromosómica. Este modelo animal demuestra que p53 es el efector de la muerte celular desencadenada por los defectos en los mecanismos de reparación del ADN.

Los modelos murinos dobles knock-out NF1<sup>-/-</sup> y p53<sup>-/-</sup> presentan un fenotipo muy similar al del astrocitoma humano (Reilly, 2000). Cuando los genes delecionados son Rb y p53, el animal desarrolla un tumor de características muy similares al meduloblastoma (Marino,2000).

### **I.4.5. Síndrome de Li-Fraumeni (SLF).**

Los pacientes pertenecientes a familias con este síndrome sufren mutaciones en la línea germinal de p53 (Malkin,1990; Srivastava,1990) que resultan en una inactivación de la proteína (Frebourg,1992, a,b). La transmisión en las familias sigue un patrón de herencia autosómica dominante. El síndrome de Li-Fraumeni se caracteriza por: i) aparición de un caso de sarcoma antes de los 45 años, ii) un familiar de primer grado con alguno de los tumores asociados (sarcoma, cáncer de mama, tumor cerebral, leucemia o carcinoma suprarrenal) y iii) familiar de primer o segundo grado con cualquier cáncer diagnosticado con edad inferior a 45 años o bien sarcoma diagnosticado a cualquier edad.

No todas las familias con LFS presentan mutaciones de p53. Cuando se analizan los 11 exones de p53 el porcentaje de mutaciones detectado alcanza el 71% (Varley,1997). Cuando se estudia el tipo de mutaciones encontradas en las familias con LFS, se observa que predominan las mutaciones sin sentido en las zonas de unión al ADN. Además, en las familias que presentan este tipo de mutaciones los tumores se presentan a edades más tempranas y con predominio de tumores cerebrales y de mama en comparación con las familias con mutaciones que originan una proteína truncada (Birch,1998). No obstante, se han descrito mutaciones en los dominios de tetramerización y mutaciones que afectan al proceso de "splicing". (Varley,1998; Varley,1996).

El efecto del alelo de p53 mutado en el desarrollo del tumor en estas familias, está mediado por la inestabilidad genómica asociada (Liu,1996).

En dos familias con un fenotipo similar al síndrome de Li-Fraumeni se han identificado mutaciones en el gen Chk 2 que codifica una proteína con actividad de "checkpoint" en G2. (Walworth,1996; Bell, 1999).

### **I.4.6. Bases de datos y recursos de la web**

La información disponible en la red sobre p53 está organizada en distintas bases de datos, siendo la más importante la patrocinada por la IARC:

Hernández-Boussard T, Rodriguez-Tome P, Montesano R, Hainaut P. IARC p53 mutation database: a relational database to compile and analyze mutations in human tumors and cell lines. International Agency for Research on Cancer. Hum Mutat 1999;14:1-8 a la que se puede acceder en <http://www.iarc.fr/p53> Otros sitios de interés que proporcionan además vínculos múltiples son: <http://www.dundee.ac.uk> p53OMIM (On line Mendelian Inheritance in man): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> OMIM :191170

Web review of p53: <http://bioinformatics.weizmann.ac.il>, <http://perso.curie.fr>

## **I.5. p53 Y NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS.**

### **I.5.1 Patología neoplásica mieloide**

#### **I.5.1.1. Leucemias agudas mieloblásticas (LAM).**

Las mutaciones de p53 son frecuentes en líneas celulares generadas a partir de casos con leucemias agudas mieloblásticas (HL-60 de leucemia aguda promielocítica, CMK megacariocítica, ML-1 mieloide) (Sugimoto,1992), lo que sugiere que estas lesiones pueden contribuir a la inmortalización celular. Sin embargo, la presencia de mutaciones en pacientes con LAM es rara. Los estudios efectuados al principio de la década de los 90, sugerían una frecuencia del 10-15% (Hu 1992; Kurosawa 1995; Slingerland 1991). En estos trabajos se incluían un elevado porcentaje de pacientes con monosomía de los brazos cortos del cromosoma 17 (17p) en los que las mutaciones de p53 pueden alcanzar el 50% de los casos. También se han descrito mutaciones de p53 asociadas a translocaciones cromosómicas en las que participa 17p (Wang,1997). En un trabajo de Soenen et al (Soenen, 1998) se analizan 17 casos con delección/translocación de 17p. De estos casos sólo 6 fueron diagnosticados de LAM y el resto correspondían a síndromes mielodisplásicos. En tres de estos pacientes, del grupo de LAM, se identificaron mutaciones de p53. Estos autores han definido unas alteraciones típicas de los granulocitos asociadas a dicho síndrome consistentes en anomalías pseudo Pelger-Huet y vacuolización de los neutrófilos.

La mayoría de las mutaciones descritas se localizan preferentemente, como en otros tipos de cáncer, en las zonas conservadas del dominio de unión al ADN y corresponden a mutaciones por cambio de sentido, aunque también se han descrito mutaciones que desplazan el molde de lectura. En un paciente se ha documentado la presencia de dos mutaciones por cambio de sentido en forma de doble heterocigoto para las dos mutaciones: G->C 135 en un alelo y A->G 246, en el otro alelo (Slingerland, 1991).

La presencia de mutaciones de p53 en subgrupos moleculares de LAM ha sido parcialmente estudiada. Así se sabe, que:

- i) son extremadamente raras en leucemias agudas promielocíticas (t(15;17) PML/RAR $\alpha$ ) (Longo, 1993) o con reordenamientos AML1/ETO y CBF $\beta$ /MYH11 (Treca, 1994, Matozaki, 1995). Estos subtipos de LAM se han asociado a buen pronóstico con esquemas terapéuticos definidos. P53 estaría alterado por un mecanismo transcripcional en las LAM con inv 16 (Britos-Bray, 1998).
- ii) las mutaciones de p53 son relativamente comunes en LAM diagnosticadas en niños de menos de 1 año de vida (Lanza,1996). En estos casos se asocian a reordenamientos del gen MLL (11q23).

Estos hallazgos no han podido ser confirmados por otros grupos (Megonigal, 1998).

iii) en los casos de LAM de adultos con alteraciones del gen MLL la escasez de resultados reportados sugiere que la frecuencia de mutaciones de p53 debe ser mucho menor. Este hecho podría atribuirse a la diferente génesis de estos tipos de leucemia. En un estudio reciente se ha demostrado la elevada frecuencia de mutaciones de p53 asociadas a amplificaciones de MLL en leucemias agudas mieloides secundarias a tratamientos quimioterápicos (Andersen, 2001).

A pesar de la poca frecuencia de mutaciones de p53 en LAM, se ha observado que hasta un 75% de los casos pueden presentar sobreexpresión de la proteína. La importancia de este hallazgo y los mecanismos por los que se produce todavía se discute (Rivas,1992; Schottelius, 1994; Seliger, 1996). Las mutaciones de p53 se han implicado en fenómenos de evolución clonal (Castro, 2000) y recaídas. Sin embargo este hecho no sería especialmente importante en LAM (Nakano, 1999) y tendría más valor la inactivación de ras y de flt-3. En un trabajo reciente, Zhu et al (Zhu,1999) analizaron la expresión de la proteína MSH2 que interviene en la reparación del ADN y que se inactiva en un grupo de tumores de colon. Estos autores encontraron mutaciones de p53 en el 35% de las muestras que no expresaban MSH2. Estos hallazgos sugieren que las anomalías de la reparación del ADN pueden ser particularmente importantes en un subgrupo de LAM que aunque no son comunes si que presentan una mala evolución (Horiike, 1999).

Recientemente se ha descrito un polimorfismo común en el codon 72 (Arg/Pro) de p53 que puede determinar una predisposición al desarrollo de tumores de cervix (Storey,1998; Marin, 2000). El análisis de estas variantes en pacientes con LAM no ha demostrado tener relevancia (Nakano,2000a).

Considerando los resultados obtenidos en un estudio de un elevado número de pacientes con LAM ( Nakano, 2000b), puede inferirse que las mutaciones de p53 son poco frecuentes en este tipo de neoplasia (4,5%). Se han descrito mayoritariamente en casos con deleciones o translocaciones de 17p (Gandini,1994; Sterkers 1998), se asocian a menudo a cariotipos complejos (Misawa,1998), edad avanzada, rasgos displásicos y mala evolución (Andersen, 2001).

### **I.5.1.2. Síndromes mieloproliferativos crónicos: LMC, PV y TE.**

Las alteraciones de p53, mutaciones, translocaciones o deleciones, son frecuentes en LMC (bcr/abl+), especialmente en la fase final (crisis blástica). Se asocian a un fenotipo mieloides de la crisis blástica, rara vez linfoides. Las mutaciones son más frecuentes en casos con pérdidas de 17p asociados a translocación o a formación de un isocromosoma 17, i(17q). El i(17q) se da aproximadamente en el 30% de las crisis blásticas mieloides y de éstas, el 40% presentan mutaciones del alelo restante de p53. La pérdida de 17p puede preceder a la adquisición de la mutación de p53. Los trabajos recientes sugieren, no obstante, que los efectos patogénicos del i(17q) se deberían más a la pérdida de otro gen supresor tumoral todavía no identificado y cercano

a p53, que a las propias mutaciones de p53 (Schutte,1993; Fioretos, 1999; Neubauer, 1992; Nakai, 1992).

Se ha detectado una mutación de p53 en la fase crónica de la LMC (Kurosawa, 1994) que ha desaparecido con la transformación. Peller et al (Peller, 1998) han descrito la presencia de cambios en la secuencia intrónica de p53 en pacientes tanto en fase crónica como blástica con un significado incierto.

La presencia de mutaciones de p53 también es característica de la transformación leucémica de otros síndromes mieloproliferativos crónicos bcr/abl negativos: mielofibrosis idiopática, trombocitemia esencial, policitemia vera y en algún caso de leucemia mielomonocítica crónica juvenil (Gaidano 1993; Miyauchi, 1999).

Para demostrar la importancia de la pérdida de p53 en la transición de fase crónica a la blástica de la LMC, Skorski et al (Skorski,1996) infectaron por un retrovirus portador de bcr/abl, las células de la médula ósea de ratones p53 -/- y p53+/. La infección de las células p53-/- producía un incremento de la capacidad de formación de colonias hematopoyéticas con independencia de la presencia de factores de crecimiento. Estas células presentaban una ventaja proliferativa reflejada por un incremento del porcentaje de células en la fase S+G2 del ciclo celular y una disminución de las células en apoptosis. Además estas células eran mucho más inmaduras que las p53+/. Cuando se transplantaban las células a un huésped inmunodeficiente se originaba una leucemia altamente agresiva de fenotipo mielóide. Estos efectos desaparecían con la cotransfección de p53. Por el contrario, ratones inmunodeficientes a los que se inyectaban células hematopoyéticas bcr/abl p53+/>+

### **I.5.1.3. Síndromes mielodisplásicos.**

El gen de p53 se altera muy rara vez en los casos de SMD (5-10%). Las mutaciones ocurren en aquellos subtipos de SMD de peor pronóstico (AREB, AREB-t y LMMC). Se han descrito con menor frecuencia en casos de anemia refractaria o anemia sideroblástica (Prokocimer, 1994; Imamura, 1994). Sin embargo, Padua et al (Padua, 1998) analizando 50 casos de SMD, identificaron 3 mutaciones en SMD de buen pronóstico: 2 en anemias sideroblásticas y en un caso de AR. En dos casos el cariotipo fue normal. Dos pacientes presentaban la misma mutación en el codon 248 (Arg->Gln).

De modo similar a lo que ocurre en pacientes con LAM, la presencia de la lesión citogenética de 17p es el mejor indicador de la existencia de una mutación de p53. La búsqueda de la mutación debe ser exhaustiva puesto que en algún caso, como el descrito por Kikukawa et al (Kikukawa, 1998), se identificó la mutación en una región no codificante.

## **I.5.2 Patología neoplásica linfoide**

### **I.5.2.1 Linfoma de Burkitt**

En esta categoría se engloban las proliferaciones de los linfocitos B post germinales que presentan como lesión molecular básica la dis-regulación del oncogen c-myc por efecto de las secuencias reguladoras de los genes de las inmunoglobulinas. Como marcadores histogenéticos en estos casos se encuentran mutaciones en las porciones variables de las Ig y en la región promotora de bcl-6. También se han detectado mutaciones en la region intrónica de c-myc. Esta activación mutacional asociada al tránsito por el centro germinal podría favorecer la adquisición de mutaciones de p53 o al menos modificar el espectro mutacional (Bhatia, 1992).

En modelos murinos con activación de c-myc se ve favorecida la inactivación del eje ARF-MDM2-p53 (Eischen, 1999). De hecho el linfoma de Burkitt y su contrapartida leucémica (LAL-L3), asociada o no a la infección por HIV, es la neoplasia hematológica en la que con más frecuencia se encuentran mutaciones de p53. Se han reportado mutaciones en 9/27 biopsias de Burkitt, en 17/27 líneas celulares y en 5/9 LAL-L3, todas ellas con reordenamientos de c-myc (Gaidano, 1991). Las mutaciones pueden encontrarse en homo o en heterocigosidad con un significado no del todo claro (Bhatia, 1993). Cuando se analizan las mutaciones de p53 mediante SSCP se observa, en la mayoría de los casos, una banda correspondiente al alelo mutado y otra banda de similar intensidad del alelo normal. En la actualidad, no es posible establecer si algunas de estas mutaciones tienen carácter dominante o la presencia de los dos alelos se debe a la presencia de tejido no tumoral en la muestra analizada. El análisis de muestras de tumor obtenidas mediante procedimientos de selección basados en láser o "sorting" permitirán aclarar estos aspectos.

Se ha demostrado que las mutaciones de p53 confieren tumorigenicidad adicional a las células con reordenamientos de c-myc (Cherney, 1997). Además la proteína p53 mutante está sujeta a una actividad transcripcional aumentada lo que justificaría los elevados niveles de proteína anormal en la célula (Balint, 1996).

En el estudio de 45 casos de Burkitt se identificaron 9 mutaciones de p53, de las cuales, en 8 los hallazgos de citogenética y/o la hemicigosidad en el SSCP sugerían que se conservaba un alelo normal. En este estudio no se encontraron diferencias en cuanto a supervivencia entre los enfermos con y sin mutaciones de p53 (Preudhomme, 1995). Los resultados de este trabajo indican que las mutaciones de p53 no confieren un pronóstico adverso a los pacientes con Burkitt. Este modelo de haploinsuficiencia sin presencia de mutaciones de p53 se ha observado en algún caso de Burkitt asociado con alteraciones citogenéticas del cromosoma 17 (Ottaggio, 1999).



### I.5.2.2 Síndromes linfoproliferativos crónicos B.

La leucemia linfática crónica (LLC) es la leucemia más común en los países occidentales. La LLC es una proliferación de linfocitos B de aspecto maduro y perfil inmunofenotípico característico (CD5+, CD23+, CD19+). Suele presentar un curso indolente y prolongado aunque en un grupo de pacientes se observa un cambio biológico con aumento de las manifestaciones clínicas asociado o no a cambios histológicos. En la actualidad no se conoce la lesión molecular aunque se han implicado genes localizados en 13q, 11q, 7q y una asociación con la trisomía 12. Atendiendo a la presencia de mutaciones en la porción variable de los genes de las inmunoglobulinas se han separado dos grupos de LLC: las formas originadas antes del estímulo antigénico (inmaduras) y las que se desarrollan en linfocitos post-germinales (maduras).

Se han identificado mutaciones de p53 en un porcentaje de pacientes con LLC que oscila entre el 11 y el 15% (Gaidano, 1991; Lens, 1997; Fenaux, 1992). Esta lesión se asocia, a menudo, con cambios citológicos típicos como son el incremento de prolinfocitos (Lens, 1997).

En un trabajo reciente, Cordone et al (Cordone, 1998) estudiaron la frecuencia de la sobreexpresión de proteína p53 en un grupo de 181 pacientes con LLC. Encontraron una expresión anormal en 27/181 casos (15%). Este porcentaje coincide con los datos de los primeros estudios mutacionales. Cuando se analizó la presencia de mutaciones de p53 en el grupo de expresión elevada, se identificaron mutaciones en 15 de 17 casos (88%). Esta elevada correlación entre la sobreexpresión y mutación de p53 en LLC es característica de esta enfermedad y, aunque necesita confirmación, proporciona un indicador pronóstico sencillo y reproducible. Los pacientes que presentaban sobreexpresión se encontraban en fases clínicas avanzadas, presentaban abundantes prolinfocitos y mostraron una mala respuesta al tratamiento con supervivencias más cortas.

Estudios con técnicas de FISH (Döhner, 1995; Stilgenbauer, 1998; Shaw, 2000) han revelado que en un 11% de casos de LLC se observa una delección de un alelo de p53 (17p) y que este factor confiere un peor pronóstico que la existencia de otras lesiones citogenéticas, como la trisomía 12 (Geisler, 1997). En un subgrupo de pacientes con delección coexiste la mutación de p53 (Gandini, 1994).

En las transformaciones de las LLC a linfomas de alto grado (Síndrome de Richter) se encuentran en más del 60% de los casos mutaciones de p53 (Gaidano, 1991; Cuneo, 1996).

La presencia de mutaciones de p53 en otros síndromes linfoproliferativos B con expresión leucémica sigue la misma regla que las identificadas en la LLC: predominio en las formas con signos histológicos o citológicos de malignidad y en fases avanzadas. En el trabajo de Lens et al (Lens 1997; Lens 1999) se analizaron 19 casos de leucemia prolinfocítica-B y en 10 de ellos (55%) se identificaron mutaciones. Este porcentaje, junto con el descrito en los linfomas de Burkitt, es el más elevado de entre todas las neoplasias hematológicas. Conviene mencionar, que en ambas patologías se encuentra activación de c-myc.

El significado de las mutaciones de p53 en linfomas de la zona marginal y en la tricoleucemia es incierto, ya que no se han identificado características biológicas particulares o mala evolución. (Baldini, 1994; Konig, 2000).

### **I.5.2.3 Mieloma Múltiple (MM).**

Las mutaciones de p53 son frecuentes en líneas celulares obtenidas de pacientes con mieloma múltiple (Mazars, 1992). Sin embargo, como ocurre en otro tipo de tumores, la presencia de mutaciones en las muestras de pacientes son mucho menos frecuentes y suelen asociarse con fases evolucionadas de la enfermedad y con mala evolución clínica. El grupo de Preudhomme (Preudhomme, 1998) describieron mutaciones en 2 de 19 casos analizados. En el trabajo de Willems (Willems, 1993) se reportaron mutaciones de p53 en 3/25 casos y en ninguna familia en las que se había observado una agregación de casos de mieloma múltiple en diferentes generaciones. Conviene tener en cuenta que el bajo número de mutaciones identificadas en esta entidad podría ser debido a que el porcentaje de infiltración tumoral está por debajo de la sensibilidad de la técnica más habitual de análisis mutacional, el SSCP (Wu, 1993).

En el MM es mucho más común la delección monoalélica de 17p13 en la región de p53. Esta lesión fué descrita en el 33% de los MM en el momento del diagnóstico y en el 54.5% en la recaída (Drach, 1998). El mismo grupo (Ackermann, 1998) no encontró delecciones de p53 en casos de gamapatía monoclonal de significado incierto.

### **I.5.2.4 Leucemias agudas linfoblásticas**

Las LAL son un conjunto de enfermedades que afectan a los precursores de los linfocitos B y T. En el caso de linfocitos B (LAL-B) y atendiendo a su distribución por edades se distinguen dos grandes grupos: las LAL de línea B infantiles que son relativamente comunes tienen un buen pronóstico y se asocian a un determinado grupo de lesiones moleculares (reordenamientos TEL/AML1, E2A/PBX, MLL y cariotipo hiperdiploide) y las LAL de línea B del adulto que son poco frecuentes y de mal pronóstico. Presentan cariotipo complejo y/o reordenamientos bcr/abl con presencia de transcritos p210 y/o p190. Las LAL-T afectan sobre todo a niños o adultos jóvenes y en casi todos los casos se puede identificar una translocación que afecta a un receptor de célula T y un factor de transcripción. La LAL es uno de los tumores asociados al síndrome de Li-Fraumeni y en algunos casos se ha podido identificar la misma mutación presente en los familiares afectados (Felix, 1992).

En las LAL-B del niño las mutaciones de p53 se concentran en casos con reordenamientos de MLL y de E2a/PBX. A pesar de la baja frecuencia ,2%, (Wada 1993), conviene señalar que la inactivación de p53 podría representar una ventaja clonal inicial y ser responsable de las recaídas. Zhu et al (Zhu, 1999), analizando un pequeño grupo de LAL en recaída en los que se detectó una



mutación de p53, utilizaron una técnica extremadamente sensible para detectar la presencia de la mutación en la muestra inicial (PCR-alelo específica) y encontraron que la mutación estaba ya presente en la muestra inicial en una subclona muy pequeña. Las mutaciones de p53 aparecen raramente asociadas a otras anomalías moleculares y en los casos que se encuentran se trata de pacientes politratados y/o en recaída.

En las LAL-B del adulto con reordenamientos bcr/abl las mutaciones de p53 se asocian a la delección de 17p (Nakai, 1993). En estos casos resulta difícil valorar la contribución de p53 al fenotipo tumoral debido a la mala evolución *per se* de esta leucemia.

Un mecanismo de inactivación de p53 relativamente común en LAL de línea B no mutacional sería la amplificación de MDM2 que se encuentra presente hasta en una tercera parte de las muestras en recaída (Marks,1996; Zhou 1997; Zhou, 2000). Estos hallazgos explicarían en parte por qué la expresión aberrante de diferentes proteínas del ciclo celular (Rb, p53, p15 y p16) se asocia a un mal pronóstico en casos de LAL de línea B del adulto (Tsai 1996; Stock, 2000).

Las mutaciones de p53 son muy comunes en líneas celulares con fenotipo T (Kawamura,1999). Además, son particularmente comunes en los casos de linfoma/leucemia de células T asociados a la infección por el virus HTLV-I (Cesarman, 1992). En muestras obtenidas de pacientes en el momento del diagnóstico, en cambio, no supera el 10%. Kawamura et al (Kawamura,1999) analizaron 57 casos y sólo encontraron mutaciones en 3 casos (5%). En pacientes analizados en recaída la frecuencia fue algo mayor (1/14, 7%). En la misma línea, Felix et al (Felix, 1994) sólo encontraron 1 mutación de p53 en 11 casos analizados. Estos datos contrastan con los reportados por Dicciani et al (Dicciani, 1994) que encontraron una frecuencia de mutaciones del 24% en muestras de LAL-T en recaída. Lo que si parece claro es que una vez adquirida la clona que contiene la mutación de p53 es estable y evolutiva conduciendo, plausiblemente, a la fase terminal de la enfermedad (Yeargin, 1993).

Las mutaciones de p53 en LAL son predominantemente de tipo cambio de sentido y se localizan en las zonas de unión al ADN (Newcomb,1995). Más recientemente, se han identificado algunas mutaciones en las zonas intrónicas (Avigad, 1997).

### **1.5.2.5 Linfomas**

El término linfoma engloba las proliferaciones tumorales de linfocitos maduros. La mayoría presentan un fenotipo B y se pueden establecer categorías diagnósticas que remedan las diferentes fases fisiológicas de los linfocitos B normales. Las entidades que por su frecuencia e importancia pronóstica conviene citar son: los linfomas foliculares (bcl2/Jh), del manto (bcl1/Jh), de la zona marginal (API/MALT y otras lesiones moleculares) (todos éstos de células pequeñas y conocidos como de “bajo grado”) y los linfomas difusos de célula grande (c-myc, bcl-6, bcl2/Jh y otras). Los primeros datos que incriminaban a p53 en la historia natural de los linfomas se

obtuvieron en líneas celulares y cuando se analizaba el cariotipo de algunos linfomas con mala evolución (Rodríguez, 1991; Li, 1995). Como sucede en el mieloma, las mutaciones de p53 no son las causantes de algunos casos familiares de linfoma (Weintraub, 1996).

En 1992 Ichikawa et al (Ichikawa,1992) analizando 48 pacientes con linfoma encontraron 9 mutaciones en pacientes con estadios clínicos avanzados e hipotetizaban que las mutaciones de p53 podrían participar en la progresión o evolución clonal de estos tumores. Un año más tarde (Sander, 1993; Lo Coco, 1993) p53 se revelaba como la lesión molecular más importante en la transformación histológica de los linfomas foliculares, más común que la adquisición de reordenamientos de c-myc o deleciones de 6q. En los casos con mutación de p53, se podía identificar una fase de duración variable en el que el porcentaje de las células positivas para p53 iba creciendo de forma gradual (Sander, 1993). Este modelo explica por qué no se ha encontrado una correlación estrecha entre sobreexpresión y mutación (Adamson, 1995; Piris, 1995; Cesarman, 1993; Maestro, 1997; Villuendas 1993; Wilson, 1996; Martínez-Delgado, 1997). La mutación de p53 se identificaría sólo cuando el porcentaje de células positivas para p53 supera el 80%. En este sentido, las mutaciones de p53 tienen un significado de enfermedad “terminal” e identifica un grupo de pacientes con muy pocas esperanzas de curación. Son numerosos los trabajos en los que se describen, por ejemplo, las características de los linfomas del manto con mutaciones de p53 (Louie, 1995; Hernández, 1996; Greiner, 1996; Zoldan ,1996).

Las mutaciones de p53 tendrían un significado un poco diferente en los linfomas de la zona marginal: la pérdida alélica o la mutación pero no ambas serían indicativos de fases iniciales del tumor y sólo se produciría la transformación histológica cuando coincidiesen ambas lesiones (Du ,1995;Tapinos, 1999). Conviene mencionar aquí que las deleciones aisladas sin mutaciones son poco comunes en las transformaciones de linfomas de bajo grado (Clodi ,1997).

Por lo que respecta a los linfomas difusos de células grandes la sobreexpresión y/o mutación de p53 son relativamente comunes y se asocian a una mala respuesta al tratamiento convencional (CHOP). Las mutaciones de p53 se pueden encontrar asociadas a cualquier otra lesión molecular típica (bcl6, bcl2, myc,etc) (Farrugia, 1994; Koduru, 1997).

Ichikawa et al. (Ichikawa,1997) analizaron un grupo de 100 pacientes con linfomas de alto grado y en el 22% encontraron mutaciones de p53 que se asociaron a mal pronóstico. El hallazgo de mutaciones de p53 cobraba especial relevancia en el grupo de pacientes sin signos clínicos adversos (IPI bajo) ya que la presencia de mutaciones de p53 también se asociaba a mala evolución. A pesar de los resultados de estos trabajos, el análisis mutacional de p53 no se ha incorporado como factor de estratificación en los protocolos de tratamientos de los linfomas agresivos. A la inactivación de p53 se ha sumado la descripción de la inactivación de p16 como factor de mal pronóstico en linfomas de alto grado (Gronbaek, 2000; Moller ,1999).

El tipo de mutaciones encontradas sigue las reglas generales descritas (cambio de sentido y zonas de unión al ADN) aunque se han encontrado mutaciones en los exones 4 y 10 (Kocialkowski, 1995).

Los linfomas cutáneos tienen un fenotipo T y un curso crónico que puede evolucionar a una leucemización (Síndrome de Sézary) o bien a una fase terminal similar a un linfoma de alto grado (Diamandidou,1998). Estudios de inmunohistoquímica revelan (Lauritzen, 1995, McGregor, 1995) que la proteína p53 está anormalmente expresada en aquellos casos con histología más agresiva. McGregor et al (McGregor,1999) analizaron 66 muestras correspondientes a 55 pacientes con linfomas cutáneos y encontraron 14 mutaciones, que mayoritariamente se localizaban en dímeros de pirimidinas. Esta lesión en p53 está típicamente asociada a los efectos de las radiaciones ionizantes lo que hace suponer a estos autores que los linfomas cutáneos podrían tener una relación causal con los efectos nocivos de la radiación solar. Otra explicación alternativa podría estar en la contaminación por queratinocitos con mutaciones de p53 cuando se utilizan técnicas de secuenciación basadas en la reacción en cadena de polimerasa (Jonason,1996).

La enfermedad de Hodgkin es considerada hoy en día como un tipo particular de linfoma B en el que los elementos reactivos predominan sobre las células neoplásicas. Estudios inmunohistoquímicos han revelado que en la tercera parte de los casos se encuentra sobreexpresión de p53 en las células de Reed-Sternberg (Doussis, 1993). En el año 1993 (Trümper, 1993; Gupta, 1993) se describieron mutaciones de p53 en muestras obtenidas de pacientes y líneas celulares de Hodgkin. Sin embargo, con las técnicas más modernas de disección tisular Montesinos-Rongen et al (Montesinos-Rongen, 1999) no encontraron ninguna mutación en los exones 4-8 de 8 pacientes en los que se aislaron células tumorales.

### **I.5.2.6 Otras patologías neoplásicas linfoides: linfoma/leucemia NK**

Las proliferaciones neoplásicas de las células NK suelen presentarse en forma de tumores de la línea media con rápida leucemización y/o resistencia a los tratamientos convencionales. Estos procesos son más comunes en el Extremo Oriente y se asocian con la integración del virus de Epstein-Barr. No se conoce la lesión molecular implicada en el origen de este particular grupo de enfermedades pero se han encontrado deleciones de 6q. Li et al (Li,2001) analizaron un grupo de 42 pacientes con esta entidad y encontraron mutaciones en 20, incluyendo casos en los que se encontró más de una mutación. En este trabajo también se describió la presencia de sobreexpresión de la proteína p53 en ausencia de mutaciones.

## II. OBJETIVOS

A la luz de los conocimientos antes mencionados, nos planteamos determinar la importancia de la detección de las mutaciones de p53 en el área de la Hematología. En primer lugar conviene describir las técnicas que permitan caracterizar de una forma relativamente simple las mutaciones de p53. En segundo lugar, precisar cual es la indicación del análisis mutacional de p53 en diferentes entidades ya sea desde el punto de vista biológico, diagnóstico o pronóstico. Por último, del análisis comparativo de nuestros hallazgos con los observados en otros tipos de neoplasias se puede conocer mejor cual es la importancia de p53 en el desarrollo del cáncer. Con la intención de contestar estas preguntas planteamos los siguientes objetivos concretos:

- Establecer la aplicabilidad del análisis mutacional de p53 en las neoplasias hematológicas.
- Analizar la contribución de las mutaciones de p53 en las transformaciones agresivas de los síndromes mieloproliferativos crónicos bcr/abl-.
- Determinar la frecuencia de inactivación de p53 en leucemias mieloides con reordenamientos MLL y con translocaciones cromosómicas que afectan a 17p.
- Estudiar la frecuencia de mutaciones de p53 en leucemias agudas linfoblásticas de línea T y B.
- Valorar el rendimiento del análisis mutacional de p53 en casos con diagnóstico morfológico de Burkitt.
- Estudiar la presencia de mutaciones en procesos linfoproliferativos de baja frecuencia: neoplasias NK y reordenamientos NPM/ALK.
- Analizar la frecuencia de mutaciones de p53 en un grupo consecutivo de pacientes con el diagnóstico de linfoma folicular en los que se detecta el reordenamiento bcl2/Jh.
- Comparar el espectro mutacional (la localización y el tipo de mutaciones) encontrado en nuestra serie con el descrito en las bases de datos de p53.

### III. RESULTADOS

### III.1. RESULTADOS METODOLOGICOS

Rapid sequencing protocol using microconcentrators.

#### **Trends in Genetics 1996; 12:167-168.**

En este trabajo se describe un protocolo de purificación y secuenciación extremadamente sencillo de fragmentos de ADN obtenidos mediante la técnica de PCR. El método es más rápido y barato que el sistema de clonaje clásico.



**III.2. LEUCEMIAS AGUDAS MIELOBLASTICAS. SINDROMES MIELOPROLIFERATIVOS  
Y  
SINDROMES MIELODISPLASICOS**

**III.2.1. Publicaciones y anexos**

Adult de novo acute myeloid leukemias with MLL rearrangements.

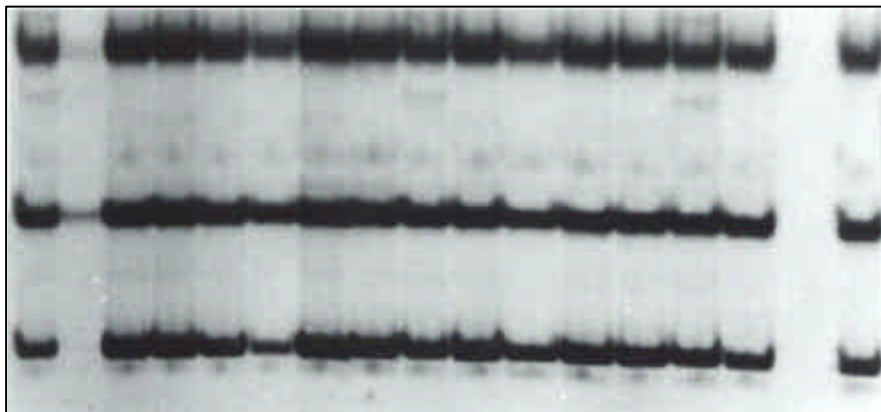
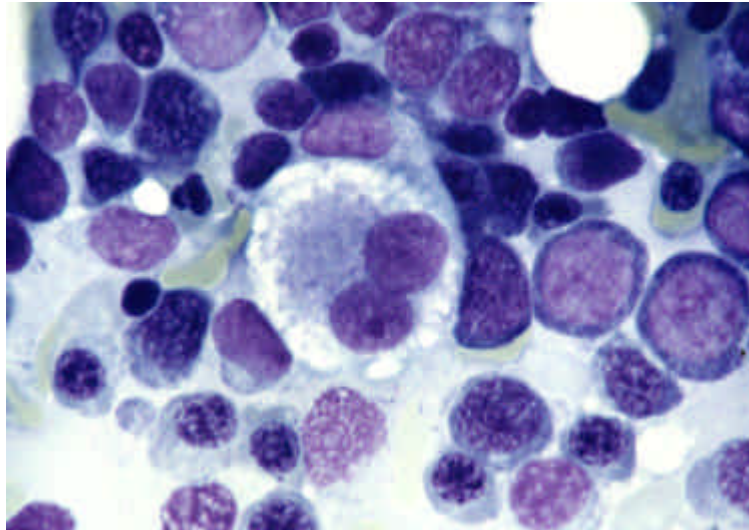
**Leukemia Research 1999;23:585-588.**

Los reordenamientos del gen MLL con translocación cromosómica asociada suelen observarse en leucemias agudas mieloblásticas con diferenciación monocítica, habitualmente del tipo M5 de la clasificación FAB. En este trabajo se muestra que los reordenamientos MLL también pueden observarse en LAM-M2, en estos casos el cariotipo es normal y se observa una duplicación en tandem de parte del gen MLL. El mal pronóstico asociado a este tipo de leucemias (duplicación parcial de MLL) no se debe a la presencia de mutaciones de p53.

Absence of p53 mutation in 15 cases of myeloid malignancies with structural rearrangements of 3q.

### **Haematologica 1999;84:757-758.**

Las lesiones estructurales del brazo largo del cromosoma 3 se cuentan entre las lesiones citogenéticas con un peor pronóstico en patología neoplásica mieloide. Aunque son poco frecuentes en todos los casos se identifican marcados rasgos dishemopoéticos y una resistencia a los tratamientos quimioterápicos. Los datos publicados en series anteriores no describen la presencia de deleciones de 17p. En el presente trabajo se confirma que cuando se analiza el ADN genómico de estos pacientes no se encuentran mutaciones de p53.

**Anexo 1.- Información adicional sobre los pacientes incluidos en el artículo precedente**

En la parte superior de la figura se puede apreciar un típico megacariocito displásico en un caso de AREB con lesión en 3q (Paciente nº 1 de la Tabla 1 del artículo precedente). Se observa una hiperplasia eritroide con predominio de formas basófilas, asincronismo madurativo y algún elemento blástico.

En la parte inferior de la figura se muestra el SSCP radiactivo correspondiente al exón 7 en los 15 casos incluidos en el estudio en los que no se observan patrones de migración anormal indicativos de mutación.

Genetic lesions associated with blastic transformation of polycythemia vera and essential thrombocythemia.

**Genes, Chromosomes and Cancer 1997;19:250-255.**

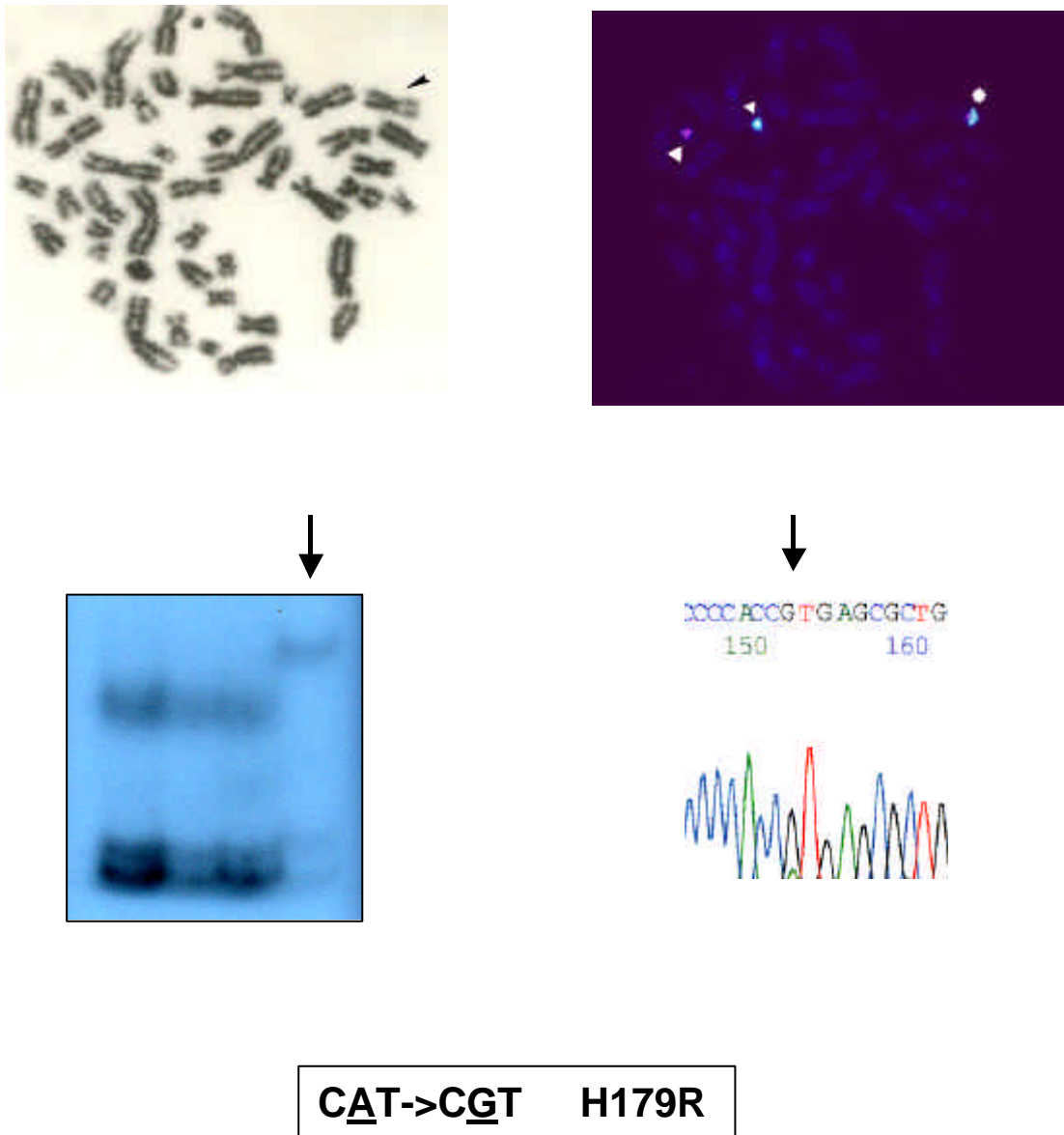
La policitemia vera y la trombocitemia esencial son síndromes mieloproliferativos crónicos que pueden evolucionar a leucemia aguda en un subgrupo de pacientes. En este estudio se investigan las lesiones moleculares observadas en ADN obtenido en la fase crónica y el obtenido en la fase de transformación. El hallazgo más importante es que en el 46% de los casos se detectan mutaciones de p53 exclusivamente en la fase blástica de la enfermedad.

**III.2.2. Mutaciones de p53 asociadas a neoplasias mieloides con reordenamientos de 17p**

Se han analizado tres pacientes con estas características y se ha identificado la mutación de p53 en dos de ellos. La Tabla siguiente muestra el diagnóstico hematológico junto con los hallazgos citogenéticos detectados mediante citogenética convencional y estudios con FISH.

**Tabla II .- Datos clínicos y citogenéticos de tres pacientes con der(17;18)**

Caso	Diagn	Sexo	Edad	Cariotipo convencional	FISH	Mutación de p53
1	LMC-t	V	52	46,XY, t(9;22)(q34;q11)/45,XY, t(9;22)(q34;q11),der(17;18)(q10;q10)	dic(17;18)(p11;p11)	-
2	LAM	V	51	46,XY/45,X,-Y,del(5)(q11q33),+8,add(12)(q23),der(17;18)(q10;q10)	dic(17;18)(p11;p11)	+H179R
3	AREB-t	V	85	46,XY/46,XY,del(5)add(7)(q11),t(7;15;?)(p15;q22;?),+8,add(11)(q23),-13,der(17;18)(q10;q10),-18,-21,+3mar	dic(17;18)(p11;p11)	+G199V

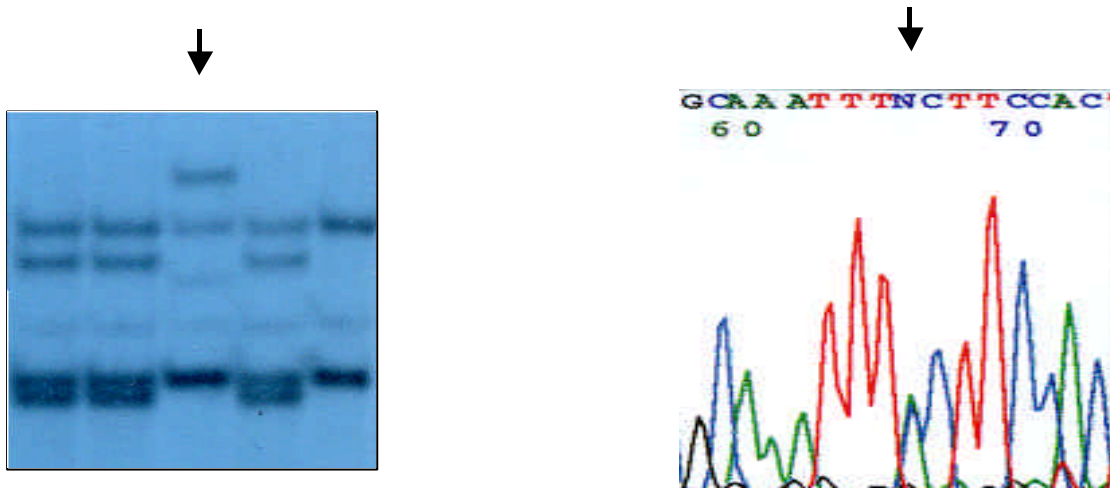


El caso 2, se trata de varón de 51 años diagnosticado de LAM. Al analizar el gen p53 se identificó la presencia de un cambio A>G en el codon 179 de dicho gen (H179R).

La parte superior de la figura muestra los estudios citogenéticos que evidencian un cariotipo 45,X,-Y, del(5)(q11q33),+8,add(12)(q23),der(17;18) (q10;q10).

La parte inferior muestra el patrón de migración anormal en SSCP del exon 5 de p53, junto con la secuencia parcial de dicho exón en la que se evidencia la mutación.





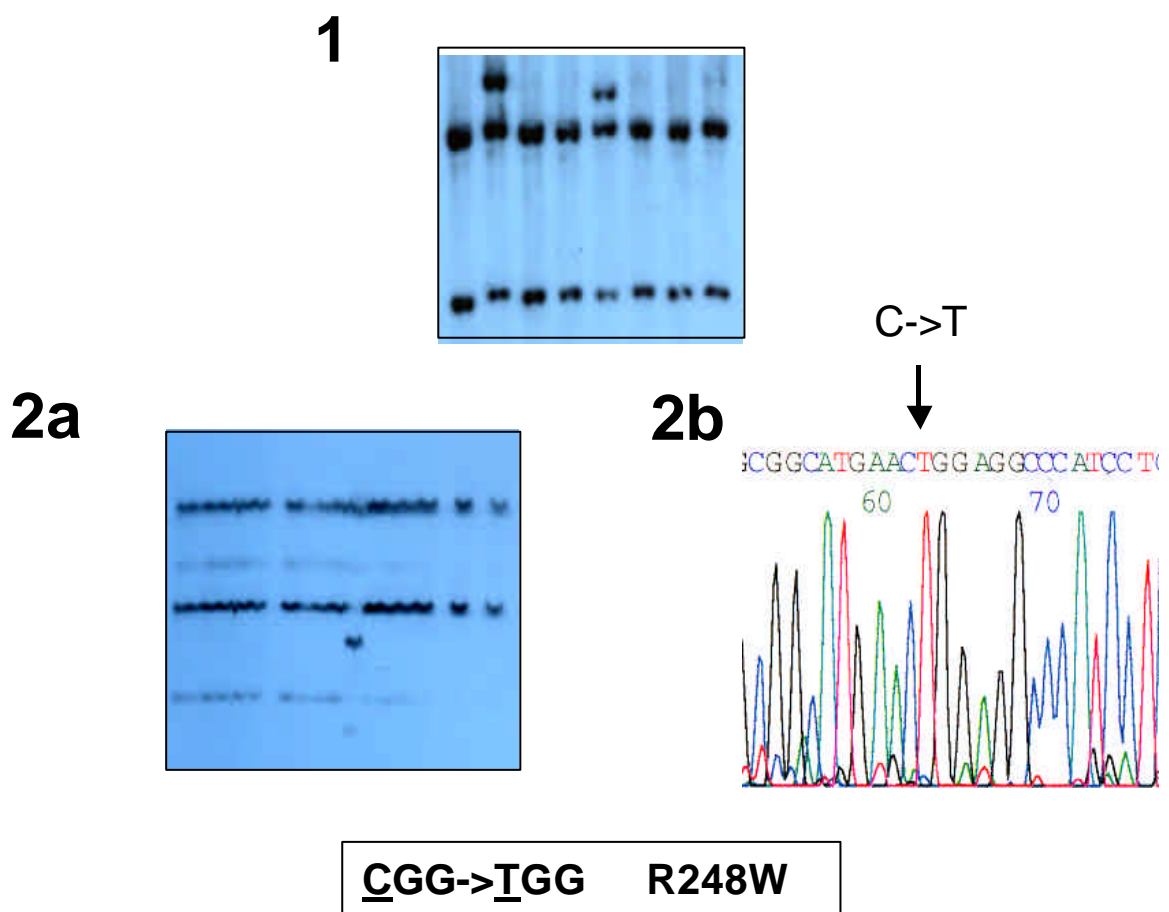
**GGA->GTA    G199V**

El caso 3 corresponde a un varón de 85 años diagnosticado de AREB-T. En la parte izquierda se muestra el patrón de SSCP correspondiente al exón 6 del gen p53. En la parte derecha de la figura se ilustra la secuencia de la región del gen que contiene la mutación. El análisis mutacional del gen p53 reveló la presencia, en heterocigosis, de un cambio G>T en el codon 199 (G199V).

### III.2.3 Mutación de p53 en un caso de LAM con reordenamiento MLL

En la muestra de ADN de una paciente de 53 años diagnosticada de LAM con un cariotipo complejo ( 46,XX,-3,del(5)(q13q33),del(8)(p11),add(12)(p13),-20,+mar1 ) se analizó la existencia de reordenamiento del gen MLL. Para ello el ADN genómico se sometió a digestión enzimática con BamHI, HindIII y Bgl II. La sonda empleada para la hibridación fue B859 que reconoce la región del bcr ("break point cluster region") del gen MLL. Únicamente el empleo del enzima Bgl II reveló la presencia del reordenamiento. En la parte superior de la siguiente figura se muestra la autorradiografía correspondiente a dicho Southern. El estudio mutacional de p53 mediante SSCP de diferentes exones del gen, evidenció un patrón de migración anormal en el exon 7 (2 a). En la secuencia correspondiente (2b) aparece la mutación C>T en el codon 248 del gen p53. Este cambio comporta la sustitución de un residuo de arginina por triptófano en dicha posición (R248W).

Tanto el patrón de SSCP como la secuenciación muestran que la mutación aparece en homocigosis. La hipótesis mas plausible es la presencia de esta mutación en uno de los alelos de p53 y la falta del otro alelo por un mecanismo delecional. Este fenómeno se describe también con el término pérdida de heterocigisidad o pérdida alélica.



### III.3. LEUCEMIAS AGUDAS LINFOBLASTICAS/ LINFOMA DE BURKITT.

#### III.3.1. Publicaciones y anexos

Análisis mutacional de p53 en la leucemia linfoblástica T.

#### **Med Clin 2000;115:573-575.**

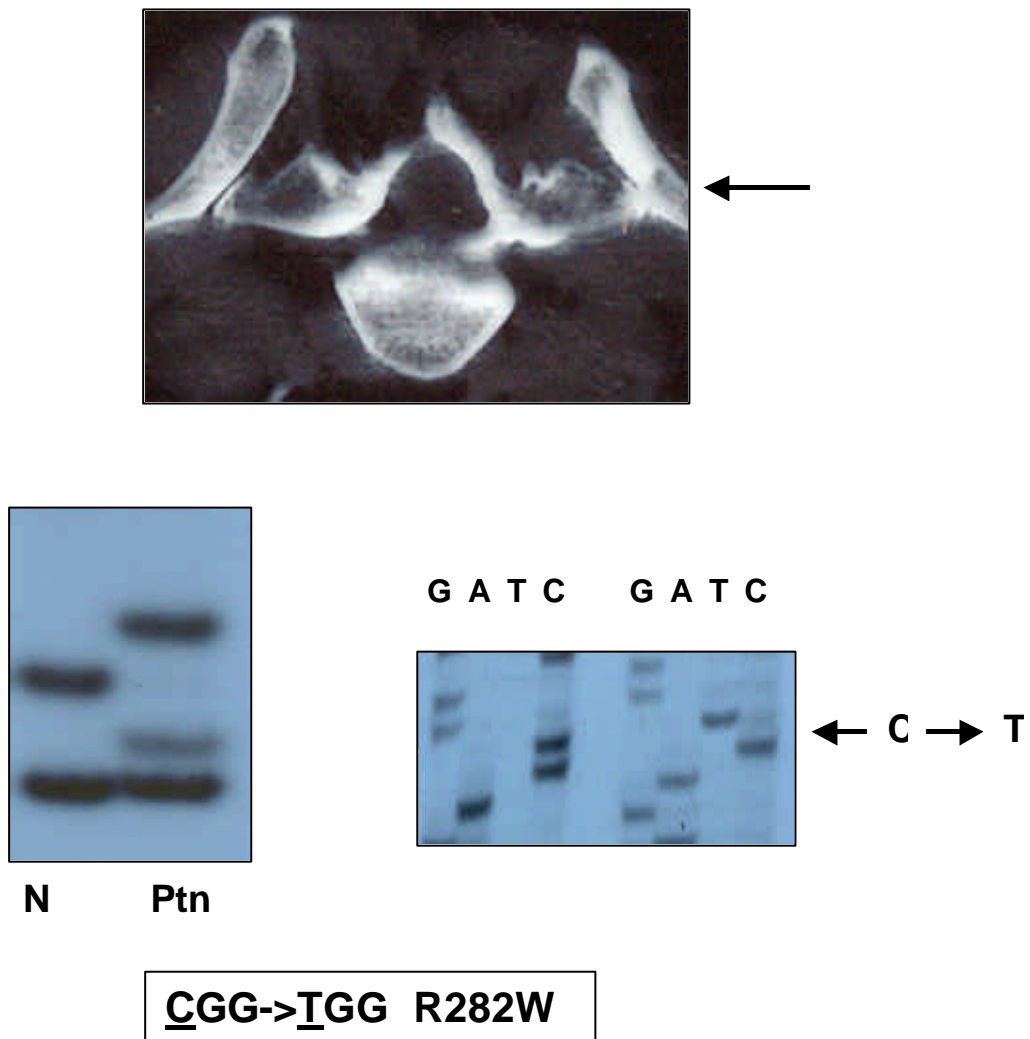
En este trabajo se analiza la frecuencia de mutaciones de p53 en la serie de LAL-T atendidas en el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau durante un período de 9 años. De los 27 pacientes analizados, en sólo un paciente en recaída se pudo encontrar una mutación de p53.

Mutational analysis of p53 in 16 cases of acute lymphoblastic leukemia and Burkitt's lymphoma.

**Haematologica 1997;82:550-554.**

En este trabajo se analiza el rendimiento del analisis mutacional de p53 cuando se establece el diagnóstico morfológico de linfoma de Burkitt o de LAL-L3. De 16 casos analizados, en 8 se pudo identificar una mutación de p53.

Anexo 2.- Datos adicionales correspondientes al paciente JSN del artículo precedente.



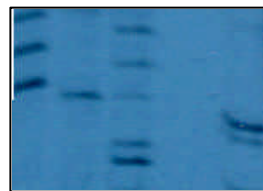
En la figura se muestra una lesión de partes blandas de localización paravertebral y con afectación del riñón. El SSCP mostró un patrón anormal en homocigosis correspondiente a una mutación en el codon 282.

Anexo 3.- Patrones de SSCP y secuencias de las regiones del gen p53 correspondientes a pacientes incluidos en el artículo precedente.

1 2 3 4 5 6



**TGT->TAT    C238Y**



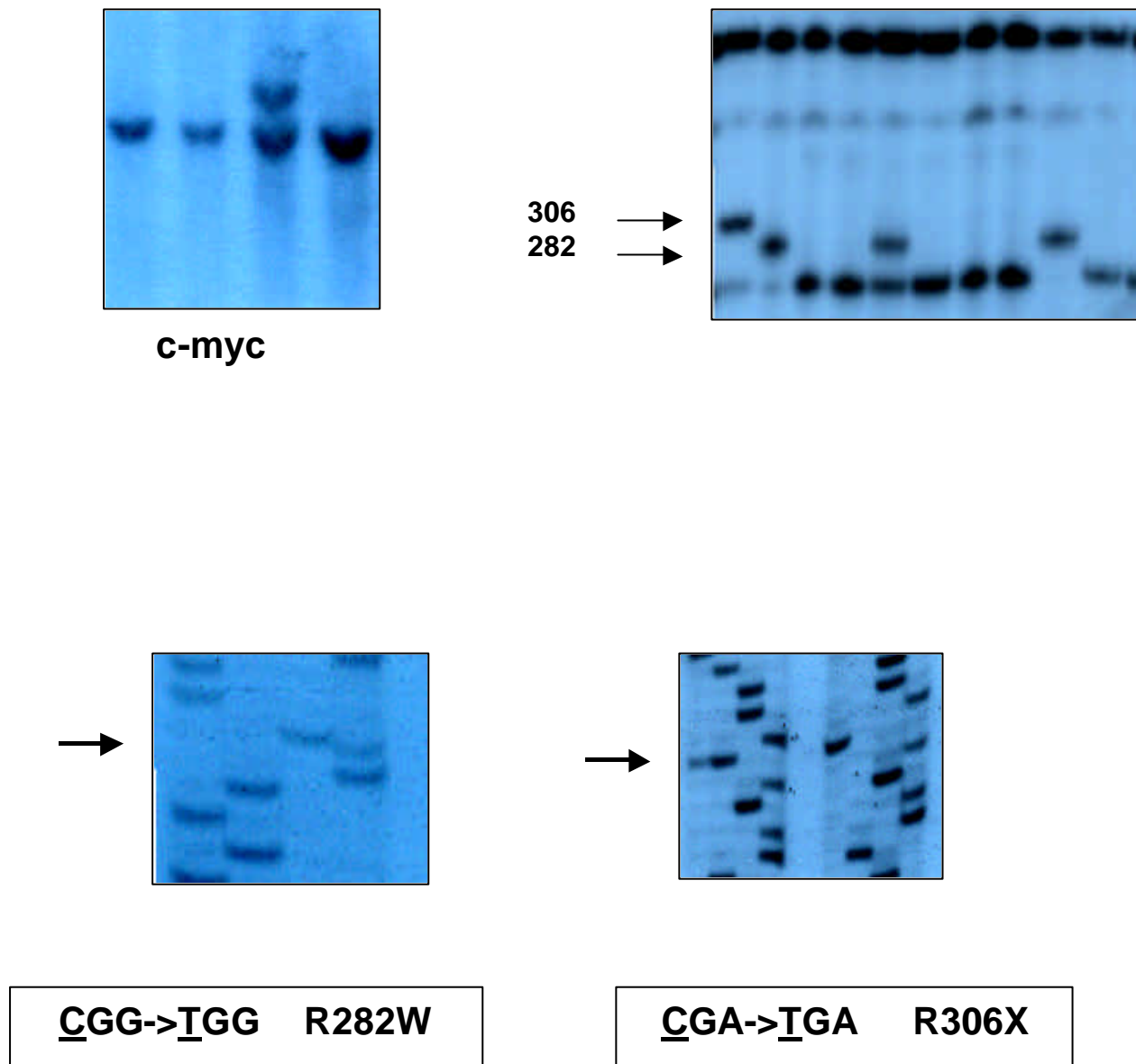
**CIG->CAG    L257Q**

En la parte superior, el patrón de SSCP del exon 7 del gen p53 identifica bandas de migración anormal: la muestra 2 corresponde al paciente FRR; la muestra 3 al paciente ACM; la muestra 4 al paciente DGP.

A la izquierda, la secuencia identifica la mutación del paciente ACM.

A la derecha, la secuencia identifica la mutación del paciente FRR.





En la parte superior izquierda se muestra el reordenamiento de c-myc detectado mediante Southern blot (EcoRI y sonda 3C4RC) en la muestra de ADN correspondiente al paciente JMA de la Tabla 1 del artículo precedente.

En la parte superior derecha se muestra el patrón de SSCP del exón 8 del gen p53. Las flechas indican las bandas de migración anormal correspondientes a los pacientes NGG, RAC, JSN y ACA de la Tabla 2 del artículo precedente.

Las imágenes de la parte inferior identifican las mutaciones que se indican.

p53 gene inactivation in acute lymphoblastic leukemia of B cell lineage associates with chromosomal breakpoints at 11q23 and 8q24.

**Leukemia 1995;9:955-959.**

Cuando se analizaron muestras correspondientes a pacientes con LAL de línea B y diferentes lesiones moleculares (reordenamientos bcr/abl, E2A/PBX, c-myc y MLL) se observó que las mutaciones de p53 se presentaban exclusivamente en los dos últimos grupos.

**Distribution of TP53 mutations among acute leukemias with MLL rearrangements.**

**Genes, Chromosomes and Cancer 1996;15:48-53.**

Los casos de leucemia aguda asociados a translocaciones cromosómicas recíprocas que originan un reordenamiento del gen MLL se asocian a mutaciones de p53 con independencia del fenotipo de la leucemia (mieloide o linfoide). La identificación de dos lesiones moleculares (MLL y p53) en niños con leucemia aguda de menos de un año sugiere que en estos casos se han producido importantes eventos mutacionales en un período corto de tiempo.

**P16 deletions in acute leukemias with TEL rearrangements.**

**Haematologica 2001;86:547-548.**

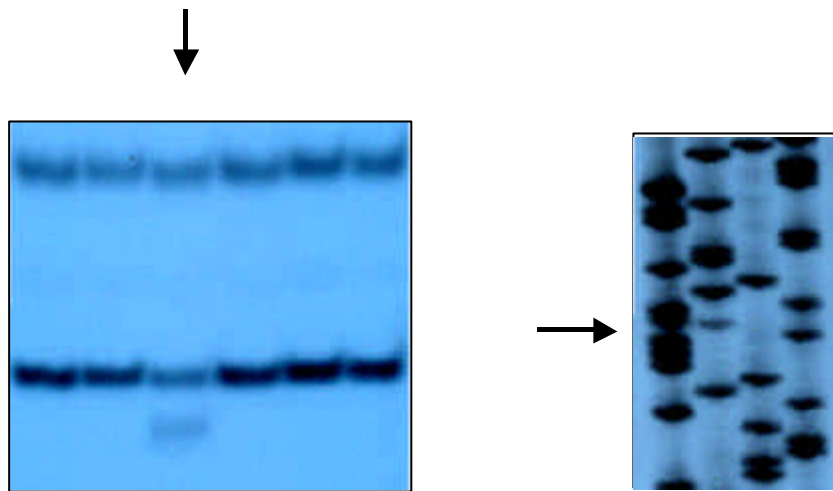
En este trabajo se analiza la presencia de reordenamientos de TEL y mutaciones de p53 en una serie de 52 niños con LAL de línea B. Los casos con reordenamientos de TEL no presentaban mutaciones de p53 y sí deleciones de p16.

### Anexo 3.- Datos adicionales correspondientes a los pacientes incluidos en la publicación precedente.

Se analizaron 52 muestras de leucemias agudas linfoblásticas de línea B (15 en el momento del diagnóstico y 37 muestras en recaída), de las cuales 13 presentaban un reordenamiento de TEL por Southern blot. En todos los casos se analizó la presencia de mutaciones de p53 mediante SSCP radiactivo de los exones 5 al 9. No se encontró ningún caso con mutaciones de p53 en el momento del diagnóstico y sin embargo en 4 muestras en recaída (11% de las muestras en recaída) se pudo constatar la presencia de mutaciones de p53. En la Tabla siguiente se detalla la naturaleza de dichas mutaciones). En tres casos con mutación se practicó estudio citogenético: en todos los casos se trataba de cariotipos muy complejos con múltiples anomalías cromosómicas.

**Tabla III. Mutaciones de p53 en niños con LAL-B en recaída**

<b>Paciente</b>	<b>Tipo de Mutación</b>
1	Codon 245 GGC->AGC
2	Codon 273 CGT->TGT
3	Codon 245 GGC->AGC
4	Codon 267 CGG->TGG



GGC->AGC    G245S

Patrón de SSCP del exón 8 del gen p53. Las flechas indican las bandas de migración anormal correspondientes a los pacientes 1 y 3. La imagen de la derecha corresponde a la secuencia de dicho fragmento anómalo.

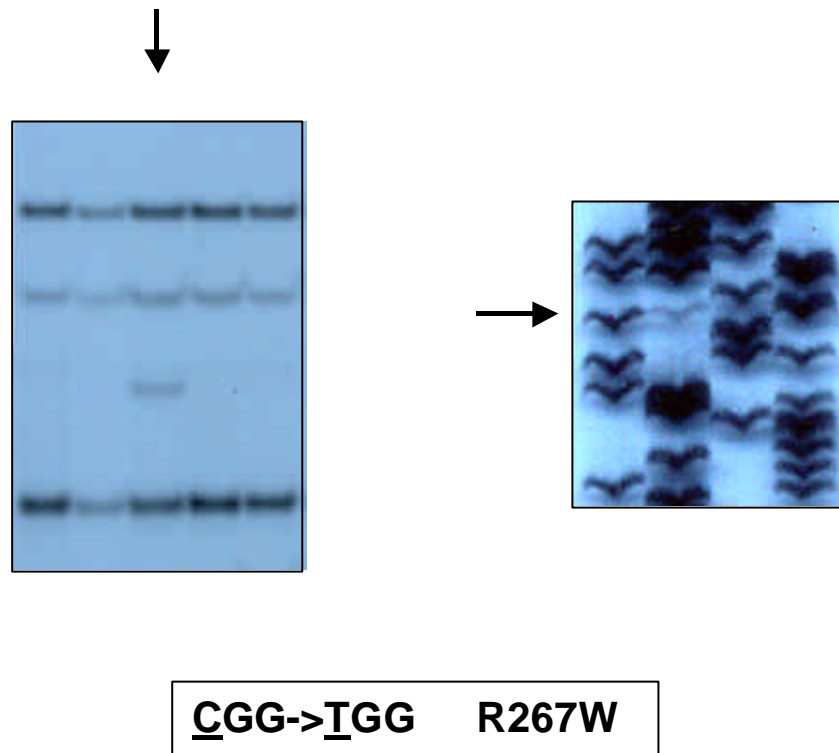
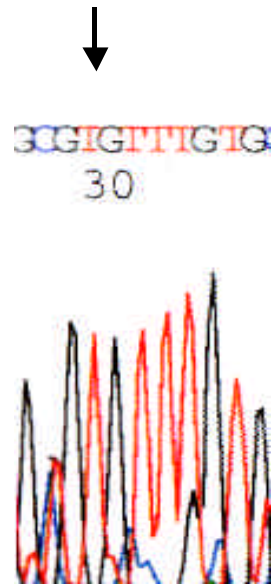
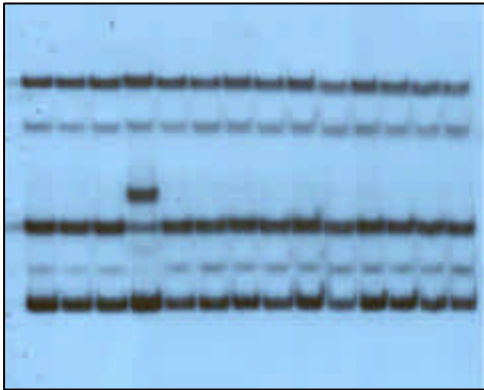


Imagen del SSCP radiactivo del exón 8 de p53 en el que se muestra una banda anormal en el carril correspondiente al paciente 4. A la derecha se ilustra la secuencia anormal correspondiente.



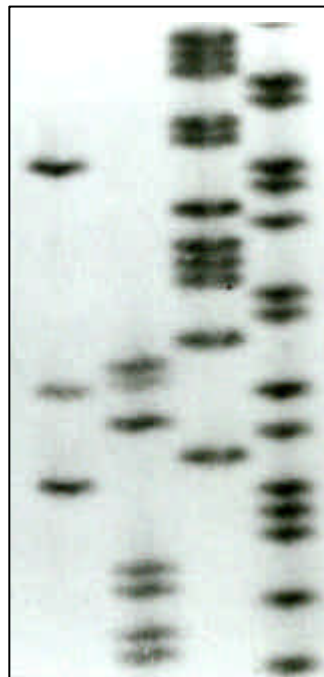
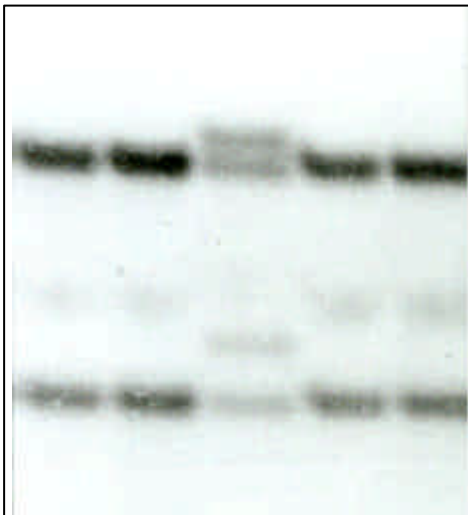
CGT->IGT R273C

SSCP radiactivo del exón 8 de p53 en el que se indica mediante una flecha la banda de migración anormal. A la derecha se muestra la reacción de secuencia con la mutación.



**III.3.2. Mutación de p53 en un caso de Linfoma de Burkitt.**

La muestra de sangre periférica de un varón de 53 años infectado por el VIH fue remitida a nuestro centro para determinar el inmunofenotipo de una leucemia aguda. Las células tumorales expresaban los siguientes antígenos: CD10,CD20,CD22, CD19, CD79b, HLA-Dr y IgL de superficie positivos con negatividad de CD34, CD33,CD13 y TdT. Con el diagnóstico de LAL-L3 se procedió a efectuar SSCP radiactivo de p53. Se detectó un patrón anormal en heterocigosis en el exón 9 de p53. La secuencia reveló un cambio g->a en la secuencia intrónica de "splicing".



**agCA CTG CCC**

**aCA CTG CCC**

### III.4. SINDROMES LINFOPROLIFERATIVOS CRONICOS.

#### III.4.1. Publicaciones y anexos.

P53 mutation in a case of blastic transformation of follicular lymphoma with double bcl-2 rearrangement (mbr and vcr).

#### **Leukemia and Lymphoma 1998;29:595-605.**

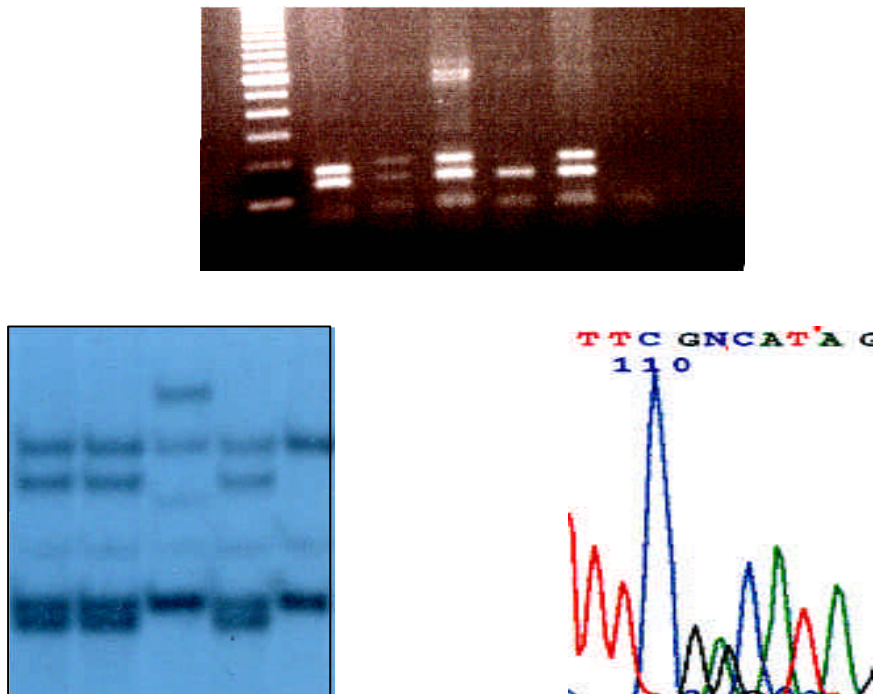
Se describe un caso de linfoma folicular transformado con reordenamiento doble (en la porción 5' y 3' del gen bcl-2) asociado a mutación de p53.

NPM/ALK rearrangements in indolent cutaneous lesions.

**Leukemia 1999;13:1291-1292.**

En casos de linfomas nodales y cutáneos con reordenamientos NPM/ALK la sobreexpresión de p53 no siempre se asocia a mutaciones de p53.

#### Anexo 4.- Estudio del polimorfismo del codon 213 en tres pacientes descritos en el artículo precedente



### Polimorfismo exón6

Detección del polimorfismo del exón 6 de p53. En el codon 213 se observa un polimorfismo CGA->CGG (Arg->Arg) que determina la abolición de una diana de restricción para el enzima TaqI. En la parte superior de la figura se muestra una electroforesis en agarosa donde el carril 5 corresponde a un paciente con el polimorfismo. En los otros carriles se observa la imagen de doble banda normal tras efectuar la digestión con TaqI. En la parte inferior izquierda se puede ver el SSCP radiactivo del exón 6. Los carriles 1,2 y 4 pertenecen a pacientes con el polimorfismo en heterocigosis mientras que el carril 3 corresponde a una mutación patogénica en el mismo exón y el carril 6 a un paciente sin el polimorfismo. En la parte inferior derecha se muestra la reacción de secuencia de un paciente con el polimorfismo.

### III.4.2. Mutaciones de p53 en linfomas NK

Aggressive natural killer cell leukemia: report of a case in a caucasian boy.

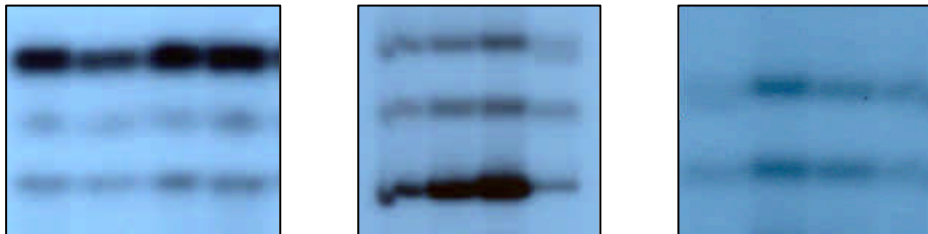
#### **Haematologica 1998;83:190-192.**

En este estudio se describen los hallazgos clínico y biológicos de un paciente con leucemia agresiva NK. Destaca la integración episomal de EBV, la ausencia de mutaciones de p53 sin reordenamiento del receptor de célula T y la deleción de 6q en el estudio citogenético.

**Anexo 5.- Análisis mutacional de p53 en tres casos adicionales de leucemia / linfoma NK.**

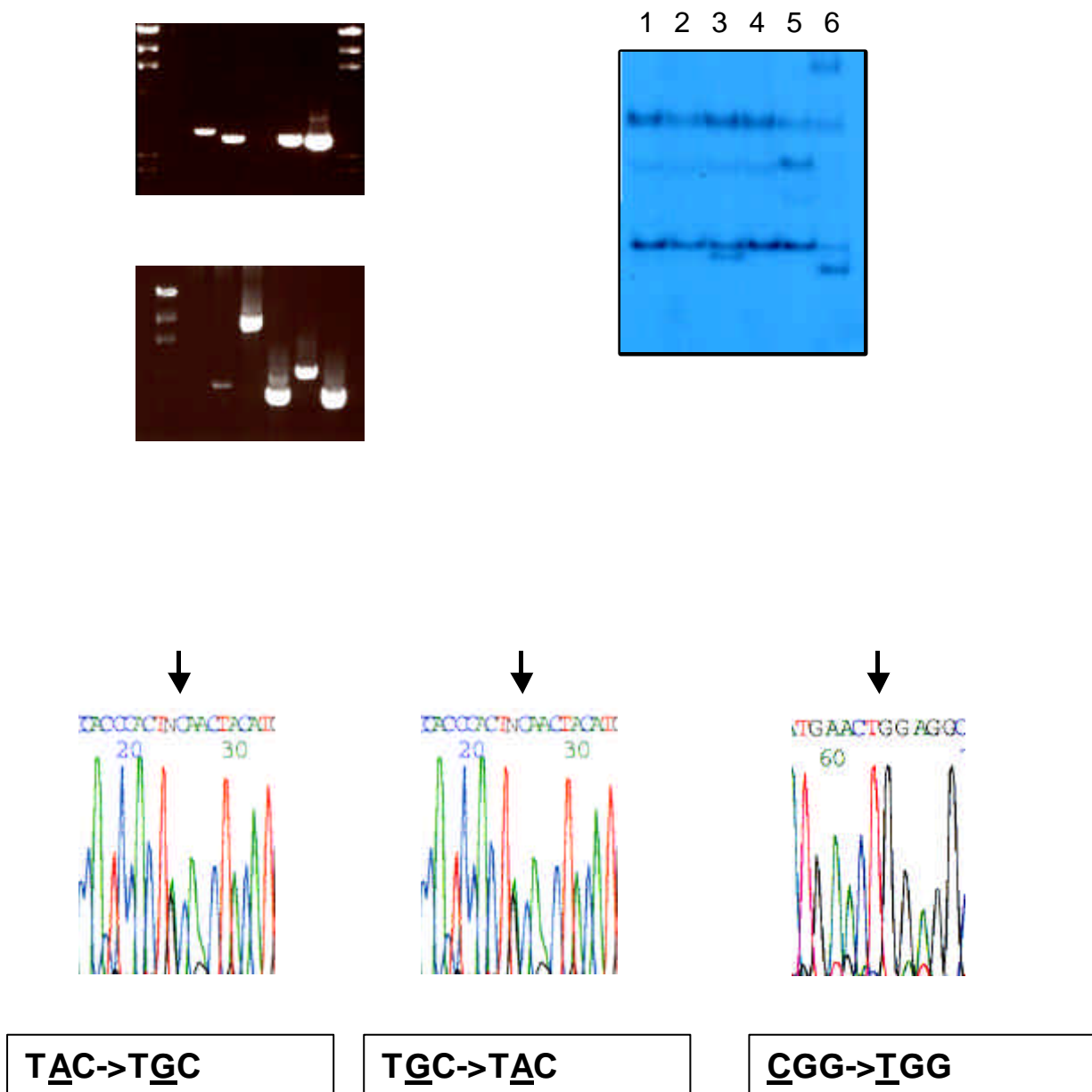
Se estudiaron 4 casos diagnosticados como linfoma/leucemia NK y no se detectaron mutaciones de p53 cuando se analizaron los exones 5-9. También se procedió a efectuar Southern blot y posterior hibridación a sondas que reconocen reordenamientos típicos de linfomas (bcl-1,bcl-2,bcl-6, c-myc, TCR $\beta$ ) encontrándose todos los casos en configuración germinal. La integración monoclonal del virus de EBV fue positiva en todos los casos sin coinfección por HHV-8.

A modo de ejemplo se ilustra, a continuación, el patrón de normalidad evidenciado al analizar mediante SSCP los exones 6, 7 y 8.



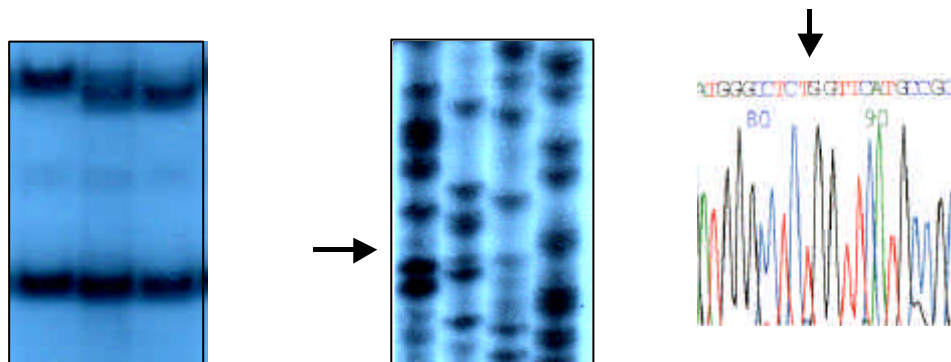
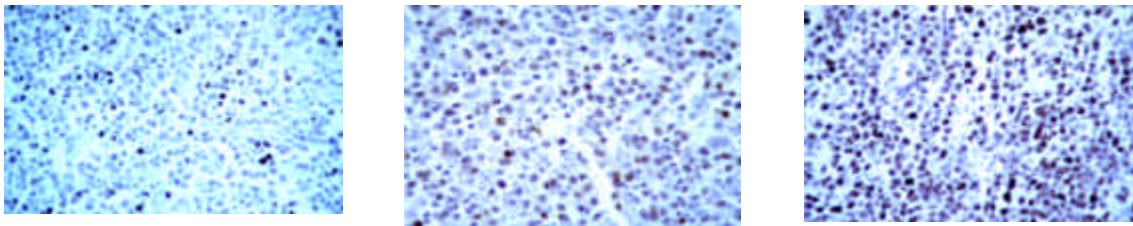
### **III.4.3. Mutaciones de p53 en linfomas foliculares.**

Se analizaron las mutaciones de p53 en todos los casos con reordenamientos bcl2/Jh que acudieron a nuestro centro durante un periodo de 18 meses. Se trataba de 26 pacientes de los cuales 25 correspondían a linfomas foliculares y 1 a una transformación agresiva de un linfoma folicular con reordenamiento de c-myc. En cinco casos se encontraron mutaciones: 4 casos correspondían a fases avanzadas de la enfermedad (estadios IV) y en 1 caso se trataba de un cambio histológico de un linfoma folicular (célula pequeña->célula grande). En 4 pacientes el reordenamiento de bcl-2 era del tipo MBR y en 1 paciente mcr. Todos los pacientes con mutación fallecieron en poco tiempo (<6 meses). Estos hallazgos demuestran que las mutaciones de p53 son comunes en linfomas foliculares y que están presente en casos en los que no se puede documentar transformación histológica.



En la figura se ilustra (superior izquierda) el reordenamiento de *bcl2/Jh* mediante una técnica de long-PCR tanto para las formas MBR (arriba) como *mcr* (abajo). En la parte superior derecha se muestra el SSCP radiactivo del exón 7 de *p53* en tres casos de linfomas foliculares en estadios avanzados en los que no se había documentado una transformación histológica. En la parte inferior pueden verse las secuencias correspondientes. La secuencia de la izquierda corresponde a un linfoma folicular con reordenamiento del tipo *mcr*.





**248 CGG->CAG R248H**

En la figura superior se muestra la inmunotinción de la proteína p53 en tres biopsias sucesivas de una paciente con un linfoma folicular. Se aprecia el incremento progresivo de las células positivas . En la tercera biosia se estableció el diagnóstico de transformación a célula grande. En la parte inferior izquierda se ilustra el SSCP radiactivo del exón 8 de p53 de la misma paciente. En el primer carril no se aprecian patrones de migración anormal, en el segundo se puede ver una banda anormal en heterocigosis y en el tercer carril la banda se encuentra en homocigosis. En la parte inferior derecha : reacciones de secuenciación de las muestras 2 y 3. La misma mutación, se identificó en un linfoma folicular sin transformación histológica.